

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

INHIBITORI IMUNOSUPRESIJE U TERAPIJI TUMORA
IMMUNOSUPPRESSION INHIBITORS IN TUMOR
THERAPY

SEMINARSKI RAD

Anamarija Salar

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Zagreb, 2015.

POPIS KRATICA

ACTH	od engl. adrenocoticotropic hormone, adenokortikotropni hormon
APC	od engl. antigen-presenting cells, stanice koje prezentiraju antigen
DC	od engl. cluster of differentiation
CD4 ⁺	pomoćnički T-limfociti (T-stanice)
CD8 ⁺	citotoksični T-limfociti (T-stanice)
CTLA-4	od engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
IFN	interferon
IL	interleukin
MHC	od engl. major histocompatibility complex, glavni kompleks tkivne podudarnosti
NK	od engl. natural killer
PD-1	od engl. programmed cell death 1
PD-L1	od engl. programmed cell death ligand 1
PD-L2	od engl. programmed cell death ligand 2
PI3K	od engl. phosphoinositide 3- kinase
PP2A	od engl. protein phosphatase 2, protein fosfataza 2
RCAS1	od engl. receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo Cells, receptor-vezujući tumorski antigen izražen na SiSo stanicama
TAP	od engl. transporter associated with antigen processing, transporter povezan s procesiranjem antigena
TCR	od engl. T cell receptor, receptor na T-stanici
TGF	od engl. transforming growth factor, transformirajući faktor rasta
Th1	pomoćničke stanice tipa 1
Th2	pomoćničke stanice tipa 2
VEGF	od engl. vascular endothelial growth factor, faktor rasta vaskularnog endotela

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
2.	IMUNOLOŠKI SUSTAV	2
3.	OSOBINE TUMORSKIH STANICA	5
4.	IMUNOEDITIRANJE	7
5.	INHIBITORNI IMUNOLOŠKI RECEPTORI	8
5.1.	CTLA-4.....	8
5.1.2.	PRETKLINIČKI MODELI TERAPIJE TUMORA.....	11
5.1.3.	ANTI-CTLA-4 ANTITIJELA.....	12
5.2.	PD-1	13
5.2.1.	BLOKIRANJE AKTIVNOSTI PD-1 U IMUNOTERAPIJI.....	14
5.2.2.	ANTI-PD-1/PD-L1 ANTITIJELA	14
5.2.3.	ANTI-PD-L1 ANTITIJELA.....	15
6.	ZAKLJUČAK.....	16
7.	LITERATURA.....	17
8.	SAŽETAK.....	19
9.	SUMMARY	19

1. UVOD

Ključne stanice koje upravljaju imunološkim sustavom i koje izravno sudjeluju u izvršavanju njegovih uloga su T-limfociti. Snaga T-stanica da obrane organizam od napada patogena mora biti u protuteži s mehanizmima koji sprječavaju destruktivni autoimunološki odgovor. Iako timus selekcijom eliminira većinu autoreaktivnih T-stanica, postoje i one stanice koje izbjegnu ovaj mehanizam središnje tolerancije te zadrže mogućnost da započnu destruktivnu autoimunu patologiju usmjerenu protiv vlastitog organizma. Imunološki sustav je razvio brojne mehanizme kako bi zaustavio autoreaktivne T-stanice i zadržao perifernu toleranciju. Tijekom imunološkog nadzora domaćin može razlikovati zdrave i zloćudne stanice. Imunološki sustav osim detekcije zloćudnih stanica ima sposobnost uništavanja istih. Postoji kompleksna mreža stimulirajućih i inhibirajućih receptora kod međustaničnih signala koja određuje ishod susreta T-stanice s određenim antigenom. Kontrolne točke imunološkog sustava (od engl. *immune checkpoints*) su molekule koje nalazimo na površini stanica, a ključna uloga im je da ograniče autoimunost preko koinhibitornih signalnih puteva.

Sposobnost T-stanica da napadaju i uništavaju tumore je odavno poznata. Također je poznato da tumori stimuliraju brojne inhibitorne mehanizme koji sprječavaju odgovor T-stanica prema vlastitom tkivu. Selektivno blokiranje ovih prirodnih inhibitornih kontrolnih točaka moglo bi ukloniti „kočnice“ koje blokiraju aktivaciju T-stanica te tako potaknuti snažan antitumorski odgovor. Brojna istraživanja su pokazala da upravo monoklonska antitijela koja blokiraju inhibitorne receptore CTLA-4 i PD-1 rezultiraju boljim ishodima za pacijente s nekim vrstama karcinoma. Ovaj seminar će razjasniti razlike u biologiji između CTLA-4 i PD-1, uključujući njihove jedinstvene molekularne strukture, uzorke ekspresije receptora i liganda, mehanizme njihovog djelovanja i djelotvornost monoklonskih antitijela kao njihovih inhibitora. Zbog razlika u molekularnim i staničnim mehanizmima djelovanja CTLA-4 i PD-1, smatra se da bi kombinirana terapija manipulacije njihovih signalnih puteva mogla biti ključna u imunoterapiji tumora.

2. IMUNOLOŠKI SUSTAV

Imunološki sustav je složeni sustav koji se sastoji od stanica i limfoidnih organa, ima važnu ulogu u otkrivanju i otklanjanju patogena (virusi, bakterije, gljivice i paraziti) i njihovih kemijskih tvari (toksina), koji bi mogli biti štetni za organizam. Još važnija uloga imunološkog sustava je u tomu da on „čuva“ organizam od vlastitih izmijenjenih stanica koje bi mogle dovesti do pojave tumora. Imunološki sustav ima 3 primarne uloge u prevenciji tumora. Prva uloga imunološkog sustava je da zaštiti domaćina od tumora uzrokovanih virusima tako da eliminira ili suzbije virusnu infekciju. Druga uloga je da na vrijeme eliminira patogene te tako spriječi uspostavu upalnog okoliša koji je pogodan za tumorogenezu. Treća uloga imunološkog sustava je ta da on može specifično identificirati i eliminirati tumorske stanice na temelju ekspresije tumor-specifičnih antigena ili molekula koje su posljedica staničnog stresa (Swann i Smyth, 2007).

Stanice imunološkog sustava koje imaju ključnu ulogu u obrani od tumora su T-stanice (T-limfociti) koje su dio specifične (stečene) imunosti. T-limfociti sazrijevaju u timusu i imaju dugi vijek u krvnoj cirkulaciji. Glavne podvrste T-limfocita su citotoksični T-limfociti ($CD8^+$ T-stanice), pomoćnički T-limfociti ($CD4^+$ T-stanice) i regulacijski T-limfociti. Nakon što je receptor, koji se nalazi na T-stanici (TCR, od engl. *T cell receptor*), prepoznao antigen na tumorskoj stanici dolazi do aktiviranja $CD8^+$ T-stanica koje mogu uništiti ciljanu tumorsku stanicu, takve stanice nazivamo citotoksičnim T-stanicama (Igney i Krammer, 2002). Citotoksične T-stanice (često se nazivaju i ubilačke stanice) su stanice koje izravno napadaju i koje mogu uništiti mikroorganizme, katkada čak i neke stanice vlastitog organizma, a također imaju sposobnost proizvodnje nekih citokina. Receptorske bjelančevine na površini citotoksičnih stanica omogućuju im da se čvrsto vežu s organizmima ili stanicama koje imaju specifične antigene. Poslije vezanja citotoksične T-stanice izlučuju bjelančevine koje stvaraju otvore (tzv. perforine) u membrani napadnute stanice te izravno u napadnutu stanicu otpuštaju citotoksične tvari. Napadnuta stanica gotovo odmah nabubri i obično se, neposredno zatim, potpuno raspadne (Guyton, 1995). Druga skupina T-stanica koje imaju ulogu u borbi protiv tumorskih stanica su pomoćničke T-stanice koje su najbrojnije od T-stanica. One na mnogo načina pomažu u djelovanju imunološkog sustava. Pomoćničke T-stanice djeluju kao glavni regulator gotovo svih imunoloških funkcija. One stvaraju različite bjelančevinske medijatore, nazvane limfokinima, koji potom djeluju na druge stanice imunološkog sustava. Funkcije pomoćničkih stanica jesu: poticanje rasta i proliferacije citotoksičnih stanica, poticanje rasta i

proliferacije supresijskih stanica i sistemska aktivacija makrofaga po cijelome tijelu. Jedan tip $CD4^+$ T-stanica, pomoćničke T-stanice tipa 1 (Th1) pomažu pri aktivaciji $CD8^+$ T-stanica. Drugi tip $CD4^+$ T-stanica, Th2 stanice stimuliraju humoralnu imunost i potiskuju razvoj Th1 stanica (Igney i Krammer, 2002). Raspodjela različitih tipova pomoćničkih T-stanica utječe na ravnotežu između stanične (Th1-posredovane) i humoralne (Th2-posredovane) imunosti. $CD4^+$ T-stanice mogu također u nekim situacijama imati citotoksičnu aktivnost. $CD8^+$ i $CD4^+$ T-stanice prepoznaju dijelove antigena u kompleksu s MHC-molekulama (od engl. *major histocompatibility complex*, glavni kompleks tkivne podudarnosti) na stanicama koje prezentiraju antigen (APC, od engl. *antigen-presenting cells*) putem T-staničnog receptora (TCR, od engl. *T cell receptor*) na svojoj površini. $CD8^+$ T-stanice prepoznaju antigene u kompleksu s MHC I-molekulama, a $CD4^+$ T-stanice u kompleksu s MHC-II molekulama (Igney i Krammer, 2002). Da bi se T-limfocit u potpunosti aktivirao potrebna su dva signala. Prvi signal je međudjelovanje TCR-a s kompleksom antigenski peptid-MHC-molekula, ovaj signal daje specifičnost imunološkom odgovoru. Drugi signal T-stanicama daje APC i time potiče njihovu klonalnu ekspanziju, proizvodnju citokina i efektorsku funkciju, ovaj signal je kostimulacijski i nije antigen-specifičan. Najbolje je istraženo međudjelovanje kostimulacijske molekule B7 na APC-u i CD28 na T-limfocitima. U odsutnosti kostimulacijskog signala antigen-specifične T-stanice ne odgovaraju učinkovito ili su funkcionalno inaktivirane te postaju otporne na daljnju aktivaciju istim antigenom. Postoje molekule koje su negativni regulatori imunološkog sustava, kao primjer možemo navesti molekulu CTLA-4 koja se može vezati na molekulu B7 te spriječiti njeno vezanje za CD28. Posljedica ovakvog vezanja je spriječen aktivacija T-stanica. Protein PD-1 također negativno regulira imunološke odgovore kroz međudjelovanje sa svojim ligandima PD-L1 i PD-L2. PD-1 izražen je na površini aktiviranih T-limfocita, B-limfocita i makrofaga što znači da PD-1 ima širi spektar djelovanja u negativnom reguliranju imunoloških odgovora od CTLA-4.

Identificirani su brojni tumorski antigeni koje T-stanice mogu prepoznati. Neke od ovih antigena, koje izražavaju isključivo tumori, nazivamo tumor-specifični antigeni. Ovakvi antigeni nastaju mutacijama ili translokacijama normalnih staničnih gena (npr. β catenin, cdk4, ras). Te mutacije mogu biti izravno povezane s nastankom tumora. Druga skupina antigena su antigeni koji nisu nužno povezani s tumorima i koji se ne izražavaju isključivo na tumorskim stanicama, već ih mogu izražavati i ostale tjelesne stanice. Pretjerano izražavanje nemutiranih proteina (npr. p53, Her2/neu) također može imati ulogu tumorskog antigena za T-stanice (Igney i Krammer, 2002).

Predložena su dva različita modela kojima imunološki sustav odgovara na tumore: koncept imunološkog nadzora (od engl. *tumor immune surveillance*) i model opasnosti (Igney i Krammer, 2002). Prema prvom konceptu imunološkog nadziranja, imunološki sustav identificira kancerogene i/ili pretkancerogene stanice kao strane stanice te ih uklanja prije nego što uzrokuju neku štetu. U ovom slučaju glavna uloga imunološkog sustava je da vrši „pregled“ tijela s obzirom na razvoj zloćudnosti i da eliminira tumorske stanice sukladno s njihovim nastankom. Tijekom imunološkog nadzora domaćin proizvodi obranu protiv stranih antigena, pazeći pri tome da ograniči aktivaciju usmjerenu protiv vlastitih antigena. Imunološke kontrolne točke su molekule koje se nalaze na površini stanica i služe kao endogeni regulatori imunološkog odgovora te ograničavaju autoimunost tako da posreduju u koinhibitornim signalnim putevima. Kod tumora su ovi putevi važni jer vode do stanja u kojem T-stanice ne reagiraju što omogućuje tumorima bijeg od imunološkog nadzora i nekontrolirani rast. Monoklonalna antitijela koja ciljaju imunološke kontrolne točke djeluju tako da blokiraju koinhibitorne imunološke puteve ili aktiviraju kostimulacijske puteve. Prvo monoklono antitijelo koje je odobrio FDA je ipilimumab. Ipilimumab je ljudsko antitijelo koje cilja CTLA-4 i odobreno je kao terapija za metastatski melanom u fazi III ispitivanja pokazujući poboljšanje u sveukupnom preživljavanju. Model opasnosti kao premisu stavlja da imunološki sustav u detekciji opasnosti koristi posebne stanice koje prezentiraju antigen (APC) prilikom oštećenja tkiva. Kada dođe do pojave signala za opasnost, APC (dendritičke stanice, aktivirani makrofazi i B-stanice) stimuliraju odgovor T-stanica.

NK-stanice (od engl. *natural killer*) su dio urođenog imunološkog sustava čovjeka te osiguravaju brzu i učinkovitu prvu crtu obrane protiv zaraznih bolesti tako da ubijaju stanice zaražene rakom, virusom ili bakterijskim patogenima. Važna uloga NK-stanica je u imunološkom nadzoru drugih stanica. Receptori na površini NK-stanica međudjeluju s bjelančevinama na površini stanice koju nadziru. Svaka NK-stanica ima dva tipa površinskih receptora - aktivatore (koji pokreću mehanizam ubijanja) i inhibitore (koji ga isključuju). Aktivnost NK-stanica kontrolirana je ravnotežom između pozitivnih i negativnih signala (Igney i Krammer, 2002). Ako stanica koja je pod nadzorom bolesna ili kancerogena dođe u kontakt s velikim brojem aktivatora na površini NK-stanice, potaknut će se širenje NK-stanice preko cijele stanice koju nadzire. Tijekom tog procesa širenja, NK-stanica neprestano "čita" signale za aktivaciju i inhibiciju s kontaktne površine sa stanicom koju nadzire. Ako dominira aktivacijski signal, NK-stanica produžuje vrijeme kontakta sa stanicom koju nadzire i u

konačnici je ubija. Ako je stanica zdrava, u kontaktu je s više inhibitora NK-stanice, potiče se dominacija inhibicijskog signala i ne dolazi do procesa širenja. NK-stanica tada brzo prelazi u nadzor druge stanice. Dodatne stanice imunološkog sustava koje sudjeluju u borbi protiv tumora su makrofagi i neutrofili. Oni mogu odbiti tumorske T-stanice tako da unište samu stanicu. Također imaju sposobnost da „otkriju“ tumorske antigene i da stimuliraju druge stanice imunološkog sustava, npr. CTL i APC.

3. OSOBINE TUMORSKIH STANICA

Interakcija između imunološkog sustava i tumorskih stanica ima važnu ulogu u nastanku tumora. Ukoliko imunološki sustav zakaže u otkrivanju i uklanjanju transformiranih stanica posljedično se može razviti tumor. Sposobnost imunološkog sustava da uništi tumorske stanice može biti ograničena smještajem tumora na mjestima koja nisu dostupna imunološkom sustavu. Tumorske stanice mogu mijenjati ili u potpunosti izostaviti tumorske antigene te na taj način izbjeći djelotvoran imunološki odgovor; osim toga tumorske stanice mogu pojačati ekspresiju inhibitornih molekula na T-stanicama (Hentges, 1995). Poznati su slučajevi u kojima imunološki sustav ne reagira na tumore, već ih zanemari. Prema modelu opasnosti, APC se ne aktivira zbog manjka signala o opasnosti. Poznati su i drugi faktori koji doprinose izostanku imunološkog odgovora. Imunološki sustav zanemari stanice tumora te one ne uspiju doći do limfnih čvorova i ne uspiju izravno aktivirati T-stanice. Također, postoje mjesta na kojima se razvijaju tumori, a da nisu nadzirana od strane imunološkog sustava (mozak, oko). Smanjenje adhezije između molekula u zloćudnom tkivu može spriječiti imunološku infiltraciju te tako doprinijeti zanemarivanju imunološkog sustava. Stroma tumorskih T-stanica također ima važnu ulogu, ona vjerojatno služi kao fizička barijera između tumorskih i imunoloških stanica (Igney i Krammer, 2002). Glavni cilj u imunoterapiji tumora jest da se postigne antitumorski imunološki odgovor, npr. korištenjem lijekova koji potiču imunološki sustav na obranu. Međutim, mnogi od ovih lijekova ne stimuliraju uspješno imunost ili ne sprječavaju daljnji rast tumora unatoč potaknutoj imunološkoj reakciji.

Poznati su brojni mehanizmi koje tumori koriste kako bi izbjegli imunološki odgovor. Jedna od strategija koju tumori koriste u bijegu od imunološkog odgovora je predstavljanje oslabljenog antigena. Defekti u prezentaciji antigena su uglavnom prisutniji kod metastaziranih stadija tumora, nego kod primarnih tumora. Smanjenje izraženosti antigena tumorskih T-stanica također može imati za posljedicu povećanu učestalost tumora i pojavu metastaza. Mutacije antigena mogu također rezultirati „bijegom“ od primarnog odgovora i

moгу doprinijeti heterogenosti tumorskih lezija. Heterogena ekspresija brojih antigena može dovesti do ometanja u uspostavljanu djelotvornog imunološkog odgovora (Igney i Krammer, 2002). Smanjena izraženost MHC-I onemogućuje imunološkom sustavu detektiranje tumorskih stanica. TAP (od engl. *transporter associated with antigen processing*, transporter povezan s procesiranjem antigena) i tapasin su dva proteina koja su uključena u prezentiranje antigenih peptida, a također su povremeno mutirana u tumorskim stanicama. Mutacija TAP-a rezultira gubitkom izraženosti MHC-I i kao posljedicu ima povećanu tumorogenezu. Druga strategija koju tumori koriste u izbjegavanju imunološkog odgovora je ekspresija imunosupresivnih faktora. Ove faktore mogu eksprimirati maligne (tumorske) ili ne-kancerogene stanice koje su povezane s tumorima, npr. određene stanice imunološkog sustava, epitelne ili tjelesne stanice (Igney i Krammer, 2002). TGF- β (od engl. *transforming growth factor β* , β faktor transformiranog rast) je najznačajniji od ovih faktora. To je citokin koji utječe na proliferaciju, aktivaciju i diferencijaciju stanica urođene i stečene imunosti te tako inhibira antitumorski imunološki odgovor. Mnoge tumorske stanice proizvode i faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF). Osim što ima angiogena svojstva, također inhibira diferencijaciju progenitora u dendritičke stanice. Ostali imunosupresivni faktori koji su izraženi na tumorskim stanicama su: prostaglandini, interleukin (IL)-10, faktor stimulacije kolonije makrofaga i topljivi tumorski gangliozida (Igney i Krammer, 2002). Membranski protein RCAS1 (od engl. *receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo Cells*, receptor-vezujući tumorski antigen izražen na SiSo stanicama) ima važnu ulogu u tumorskom izbjegavanju imunološkog odgovora, odgovoran je za inhibiciju proliferacije i induciranje apoptoze T-stanica *in vitro* (Igney i Krammer, 2002).

Induciranjem periferne tolerancije može izostati odgovor T-stanica ako su na tumorskim stanicama izraženi antigeni koji su specifični za ostale tjelesne stanice. Indukcija periferne tolerancije se u osnovi sastoji od 4 mehanizma koje tumori koriste. Prvi mehanizam koji tumori koriste kako bi inducirali perifernu toleranciju je sprječavanje izraženosti kostimulatornih molekula što može dovesti do izostanka reakcije imunološkog sustava kod antitumorskih limfocita. Drugi proces indukcije tolerancije koji tumor koristi je imuno devijacija (Igney i Krammer, 2002). U ovom slučaju imunološki odgovor ide preko Th2 humoralne imunosti te tako zaobilazi Th1 imunost posredovanu stanicama, koja je potrebna da bi se uspješno aktivirale citotoksične T-stanice protiv tumora. Tumori također mogu inducirati stvaranje pomoćničkih T-stanica koje će potisnuti odgovor citotoksičnih T-stanica protiv tumora. Sljedeći mehanizam za uspostavljanje periferne tolerancije na vlastite antigene

je delecija T-stanica (Igney i Krammer, 2002). Uzastopna stimulacija T-stanica s antigenom rezultira procesom koji možemo nazvati aktivacijom-inducirana smrt T-stanice, tj. apoptoza stanice. Tumori također induciraju toleranciju imunološkog sustava tako da uklanjanju antitumorske T-stanice.

Druge dvije strategije koje tumori koriste kako bi izbjegli imunološki odgovor su povezane s apoptozom. Prva strategija omogućuje tumoru da postane rezistentan na mehanizme imunološkog sustava koji bi ga mogli uništiti tako da tumorske stanice mijenjaju ekspresiju molekula koje su uključene u signaliziranje apoptoze. Druga strategija je poznata pod nazivom protunapad tumora, jer tumori uspiju prilagoditi mehanizme citotoksičnih imunoloških stanica tako da uklanjaju antitumorske limfocite koji ih napadaju.

4. IMUNOEDITIRANJE

Nedavna istraživanja su pokazala da imunološki sustav može olakšati staničnu transformaciju, spriječiti i kontrolirati tumorski rast te oblikovati imunogenost tumora. Ove tri uloge imunološkog sustava koje su međusobno paradoksalne mogu se odvojiti na temelju njihovog privremenog pojavljivanja prilikom nastajanja tumora, prirodi transformirajućih događaja, posebnim komponentama imunosti koje sudjeluju u svakom procesu i prirodi tumor specifičnih antigena koji su izraženi na transformiranim stanicama. Imunološki sustav može spriječiti/kontrolirati i oblikovati tumor procesom koji je poznat pod nazivom tumorsko imunoeditiranje. Ovaj dinamični proces u kojem imunološki sustav, ne samo da štiti organizam od razvijanja tumora, već i oblikuje tumore u nastajanju sastoji se od tri faze: eliminacije, ekvilibrijuma i bijega. Prilikom eliminacijske faze i urođena i stečena imunost djeluju zajedno, kako bi imunološki sustav detektirao i uništio tumore u nastajanju, prije nego što postanu klinički vidljivi. U fazi ekvilibrijuma imunološki sustav drži tumor u fazi funkcionalne dormancije. Imunološki sustav ne uklanja u potpunosti tumorske stanice, ali kontrolira njihov rast. Faza bijega tumorskih stanica od imunološkog nadzora može biti uvjetovana različitim mehanizmima: smanjenje prepoznavanja od strane imunološkog sustava (nedostatak tumorskih antigena, gubitak MHC-a ili kostimulatornih molekula), povećana (pojačana) otpornost ili preživljavanje (pojačana ekspresija STAT-3 ili anti-apoptozne molekule Bcl2) ili razvoj imunosupresivnog tumorskog mikrookoliša (citokini, npr. VEGF, TGF- β ; imunoregulatorne molekule, npr. IDO, PD-1/PD-L1, Tim3/ galectin-9, LAG3; Mittal i sur., 2014).

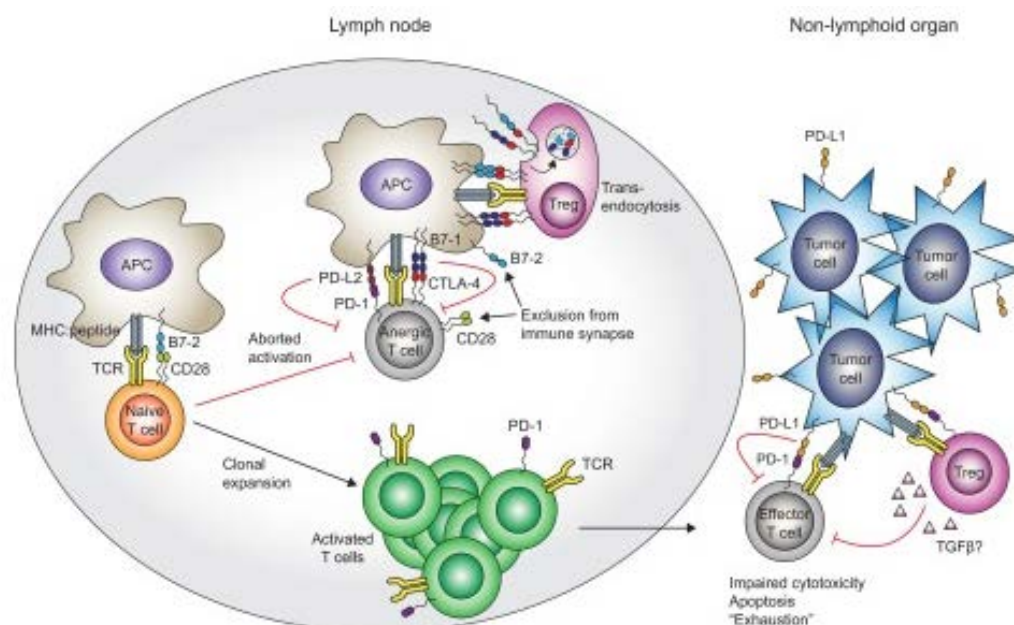
5. INHIBITORNI IMUNOLOŠKI RECEPTORI

Tumori mogu zaobići imunološki nadzor stimulacijom inhibitornih receptora čija je uloga „isključenje“ imunološkog odgovora. Blokiranjem tumora u stimulaciji inhibitornih receptora T-stanica možemo dobiti djelotvoran antitumorski odgovor kod životinja. Prema tome blokiranjem inhibitornih imunoloških kontrolnih točaka možemo potencijalno povećati antitumorsku imunost. CTLA-4 i PD-1 su dva inhibitorna receptora na T-stanicama koji imaju neovisne mehanizme djelovanja. Pretklinička istraživanja su otkrila da molekula CTLA-4 smanjuje proliferaciju tumorsko-specifičnih T-limfocita. Primarna uloga proteina PD-1 jest ta da je on stop signal koji ograničava funkciju T-limfocita, B-limfocita i makrofaga. Zbog jedinstvenih mehanizama i načina djelovanja CTLA-4 i PD-1, moguće je da blokiranjem bilo kojeg od njih potenciramo antitumorski imunološki odgovor; blokiranjem oba postoji mogućnosti pokretanja čak i jačeg antitumorskog odgovora.

5.1. CTLA-4

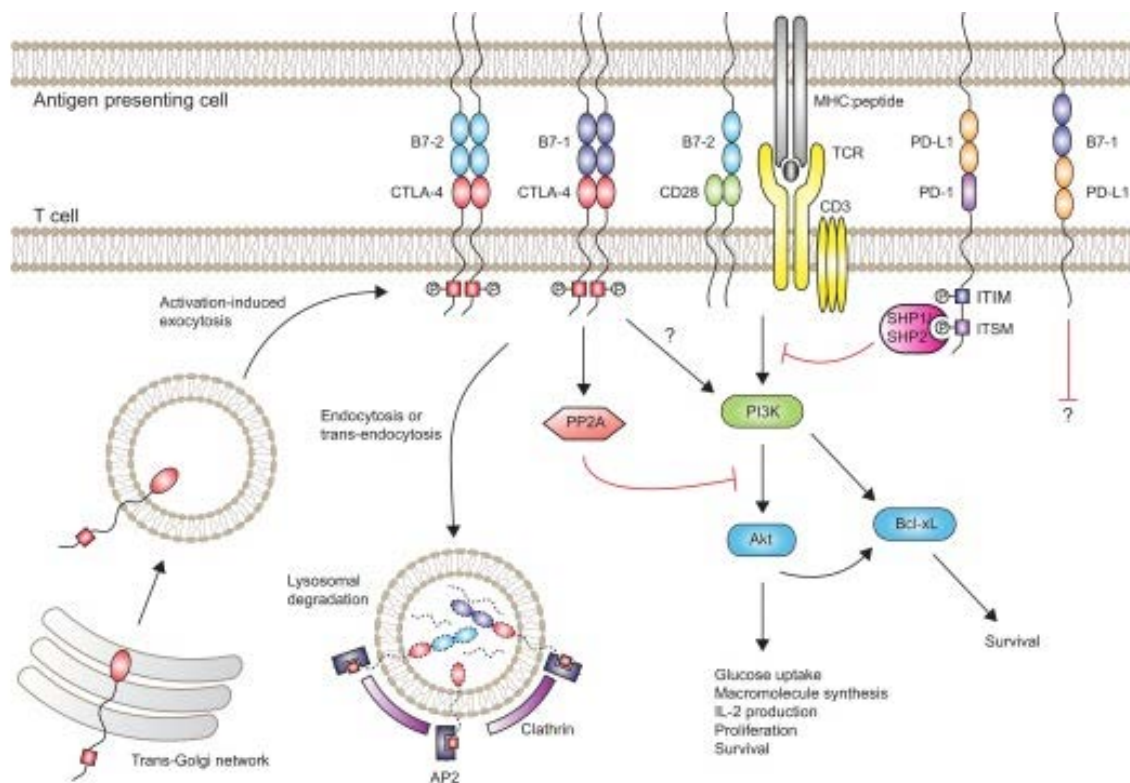
CTLA-4 (antigen 4 povezan s aktivnošću citotoksičnih T-limfocita) je inhibitorni koreceptor koji je izražen na aktiviranim T-stanicama, tj. na površini $CD4^+$, $CD8^+$ i $CD25^+$ stanica. Molekula CTLA-4 je imunološka kontrolna točka koja inhibira aktivaciju T-stanica. Interakcija između CTLA-4 i B7 molekule koja je izražena na površini APC-a kompetitivna je u odnosu na vezanje CD28 i narušava aktivaciju T-stanica. CTLA-4 je transmembranski glikoprotein koji pripada CD28/imunoglobulin superobitelji, sastoji se od 4 domene: signalnog peptida, ligand-vezujuće domene, transmembranske domene i kratkog citoplazmatskoga repa. CTLA-4 stvara kovalentno vezane heterodimere koji se vežu na oligomerizirane B7-1 i B7-2 ligande sa većim afinitetom od CD28 (Intlekofer i Thompson, 2013). Postoje razne varijante CTLA-4 spojeva; neke od njih su topljivi spojevi, a neki ligand-neovisni spojevi koje nalazimo u miševima. Polimorfizam kod topljivih verzija CTLA-4 uočen je kod autoimunih poremećaja uključujući Graveovu bolest, Hashimoto tireoiditis i dijabetes tipa 1 (Intlekofer i Thompson, 2013). Također, postoje i polimorfizmi kod ligand-neovisnih spojeva koji bi mogli imati važnu ulogu u patofiziologiji dijabetesa kod NOD miševa. Pretpostavlja se da ligand-neovisna izoforma CTLA-4 inhibira autoreaktivne T-stanice. CTLA-4 je primarno izražen na T-stanicama, međutim uočena je i mogućnost izraženosti na B-stanicama. Kada se stanica nalazi u stanju mirovanja, CTLA-4 minimalno je izražen za razliku od CD28 koji je izražen na površini T-stanica i u stanju mirovanja i u aktiviranom stanju. Kostimulacijom preko CD28 i/ili IL2 povećava se izraženost CTLA-4.

Aktivacija T-stanice zahtjeva TCR-posredovane signale (signal 1) i kostimulatorne signale (signal 2), koji su uvjetovani interakcijama između CD28 i molekule B7. Nakon aktivacije, T-stanice potiču izraženost inhibitornih receptora CTLA-4 i PD-1. Način reagiranja T-stanice ovisi o ravnoteži između stimulaturnih i inhibitornih signala. Kada dominiraju inhibitorni signali, koji su posredovani CTLA-4 i PD-1, aktivnost T-stanica biti će prekinuta. TREG-ovi (od engl. *regulatory T cell*, regulatorne T-stanice) mogu ukloniti B7 molekulu sa APC površine procesom transendocitoze te na taj način pomaknuti ravnotežu prema inhibitornim signalima. U tom slučaju CTLA-4 receptor ima veći afinitet za B7 molekulu te se ona veže na njega. Kada dominiraju TCR i CD28 posredovani stimulirajući signali, T-stanice klonalno se umnožavaju, potiču funkciju efektor a i prolazak kroz ne-limfoidna tkiva. Funkcija efektorne T-stanice može biti ograničena interakcijom PD-1 i PD-L1 (sl. 1).



Slika 1. Aktivacija T-stanice zahtjeva signale posredovane TCR-om i kostimulatorne signale koji su posredovani interakcijama između CD28 i B7. Nakon aktivacije, T-stanice induciraju ekspresiju inhibitornih receptora CTLA-4 i PD-1. Ravnoteža između stimulaturnih i inhibitornih signala može odrediti kako će T-stanica reagirati. Kada dominiraju inhibitorni signali koji su posredovani molekulama CTLA-4 i PD-1 ne dolazi do aktivacije T stanica. Procesom transendocitoze, TREG-ovi mogu pomaknuti ravnotežu u smjeru inhibitornih signala micanjem B7 liganda s površine APC-a. Posljedično, B7 ligand ima veći afinitet za CTLA-4 receptor. Tijekom dominacije stimulaturnih signala posredovanih TCR-om i CD-28, T-stanice se klonalno umnažaju, stječu efektorsku funkciju i putuju nelimfoidnim tkivima. Efektorska funkcija T-stanice može biti ograničena interakcijom s PD-1. Tada dolazi do ekspresije PD-L1 na površini nehematopoetske stanice, uključujući i brojne tumore. Osim toga, interakcije između PD-1 i PD-L1 mogu povećati funkciju TREG-ova te tako doprinijeti dodatnoj inhibiciji efektorske T-stanice (Intlekofer i Thompson, 2013).

Jedna od najzanimljivijih osobina CTLA-4 jest njegov unutarstanični smještaj i prijenos. Većina CTLA-4 nalazi se unutar trans-Golgijevih vezikula i u endosomalnim odjeljcima. Kod T-stanica, koje su u stanju mirovanja, mala količina CTLA-4 proteina cirkulira od Golgijeva aparata do površine stanice, potom slijedi endocitoza i lizosomalna razgradnja. Ovakav unutarstanični model prijenosa je posredovan vezom između citoplazmatskog repa CTLA-4 i proteinima AP-1 i AP2/AP50 koji su povezani sa klatrinom. Također interakcija CTLA-4 s protein-TCR-interaktivnom molekulom (TRIM) ima važnu ulogu u pravilnoj lokalizaciji i prijenosu CTLA-4 unutar stanice (Intlekofer i Thompson, 2013). Jedan od načina na koji CTLA-4 inhibira funkciju T-stanice je preko kompeticije sa CD28 za vezanje na B7 molekulu. CD28 i CTLA-4 dijele ligande B7-1 i B7-2. U usporedbi sa CD28, CTLA-4 zahvaljujući svojoj homodimernoj strukturi (može se vezati dvostrukom vezom za B7 molekule, a CD28 se veže jednostrukom vezom) ima veći afinitet za B7 ligande. Molekula B7-1 je molekula koja je izražena na površini aktiviranih APC-a. Ova molekula je primarni ligand za CTLA-4, ali ima i sposobnost interakcije sa CD28. Kinetika B7-2 i B7-1 proporcionalna je s kinetikom CD28 i CTLA-4. B7-2 je izražen na APC molekuli u stanju mirovanja te se nastavlja inducirati nakon aktivacije i postiže maksimum unutar 24 sata. Suprotno tome, B7-1 ne pokazuje znatnu izraženost na APC molekulama u stanju mirovanja, već je maksimalno induciran 48 sati nakon aktivacije APC molekule (Intlekofer i Thompson, 2013). Prema ovom modelu, interakcija između CTLA-4 i B7-1 može prekinuti reakciju u kasnijim fazama aktivacije, a interakcija između CD28 i B7-2 potiče aktivaciju T-stanica. B7-2 je ligand koji je izražen na površini APC-a u aktiviranom stanju i stanju mirovanja. Nedavna istraživanja su pokazala da postoji veza između staničnog prijenosa CTLA-4 molekule i CTLA-4 /B7 interakcija. Aktivirane T-stanice koje na svojoj površini imaju izraženu molekulu CTLA-4 spajaju se s ligandima B7-1 i B7-2 na površini APC-a procesom transendocitoze. T-stanice koje imaju CTLA-4 molekulu procesom endocitoze unose B7 molekule u lizosome te ih potom razgrađuju. Posljedica ovoga procesa je smanjenje broja B7 molekula na površini APC-a (Intlekofer i Thompson, 2013). CTLA-4/B7 interakcijom posredovana transendocitoza objašnjava nam na koji bi način CTLA-4 mogao inhibirati funkciju T-stanica (sl. 2).



Slika 2. Aktivirane T-stanice sintetiziraju CTLA-4. Unutarstanične vezikule koje sadrže CTLA-4 prenose se putem imunološke sinapse. Fosforilacija CTLA-4 na YKVM (crveni kvadrat) potiče održavanu ekspresiju CTLA-4 na površini stanice te tako sprječava AP2 i klatrin posredovanu endocitozu. Na površini stanice CTLA-4 je u konkurenciji sa CD28 u vezanju za B7 ligand. Transendocitoza B7 liganda koju posreduje CTLA-4 može ograničiti raspoloživost B7 liganda za CD28. Vezanje CTLA-4 za B7-1 ili B7-2 potiče aktivaciju PP2A (serin/treonin fosfataza) te blokira aktivaciju Akt. Suprotno tome, vezanje PD-1 za PD-L1 ili PD-L2 rezultira fosforilacijom ITSM (ljubičasti kvadrat) i ITIM (plavi kvadrat) koji se nalaze unutar citoplazmatskog repa PD-1. Fosforilirani ITSM regrutira tirozin fosfataze SHP-1 i SHP-2 koje blokiraju aktivaciju PI3K (od engl. *phosphoinositide 3-kinase*). Signali preneseni putem interakcija između B7-1 i PD-L1 mogu također inhibirati funkciju T-stanica (Intlekofer i Thompson, 2013).

5.1.2. PRETKLINIČKI MODELI TERAPIJE TUMORA

Ubrzo nakon što je otkrivena inhibitorna uloga CTLA-4, otkrivena je i mogućnost blokiranja CTLA-4 putem monoklonskih antitijela koja su potaknula otklanjanje transplantiranog karcinoma crijeva i fibrosarkoma kod miševa. Miševi koji su prethodno bili tretirani anti-CTLA-4 terapijom razvili su imunološku memoriju i mogli su odbiti naknadno implantirane tumore bez dodatnog blokiranja CTLA-4. Antitumorski učinci blokiranja CTLA-4 su primijenjeni i u terapiji ostalih tumora kod miševa, uključujući i karcinom prostate, karcinom bubrežnih stanica i limfom (Intlekofer i Thompson 2013). Antitijelo korišteno u ovim istraživanjima je bilo nestimulativno, antitijelo koje je blokiralo interakcije između CTLA-4 i B7 liganda.

5.1.3. ANTI-CTLA-4 ANTITIJELA

Klinički su ispitana dva anti-CTLA-4 antitijela, ipilimumab i tremelimumab. Ipilimumab je u potpunosti ljudsko monoklonalno antitijelo (IgG1), koje blokira CTLA-4 kako bi potaknulo antitumorsku imunost. Ipilimumab je prvo bio testiran kod metastatskih melanoma. U fazi I ispitivanja bilo je tretirano 17 pacijenata i dokazana su dva dugotrajna djelomična odgovora kod početne doze od 3 mg/kg (Tchekmedyian i sur., 2002). Djelotvornost ipilimumaba je također dokazana kada je bio korišten kao jedina terapija u fazi II ispitivanja, koja je bila dvostruko slijepa faza (ni liječnici ni pacijenti nisu znali kome se daje koja doza). Pacijentima je bila nasumično dodijeljena jedna od moguće 3 fiksirane doze (0,3, 3 ili 10 mg/kg) svaka 3 tjedna po 4 ciklusa, nakon čega je uslijedila terapija održavanja koja se primjenjivala svaka 3 mjeseca. Najbolji ukupni odgovor zabilježen je pri dozi od 10 mg/kg, a iznosio je 11.1% (Wolchok i sur., 2010). Temeljem ovih saznanja ipilimumab je testiran u fazi III u dva nasumično-kontrolirana ispitivanja, pri čemu su oba pokazala poboljšanje u ukupnom preživljenju. Prvo ispitivanje pokazalo je da je ipilimumab također djelotvoran u kombinaciji s drugim lijekovima, uključujući i cjepiva protiv tumora. Jedno od dobro istraženih cjepiva je i glikoprotein 100 (gp100). Terapija koja uključuje samo ovo cjepivo potiče imunološki odgovor, ali ima ograničenu antitumorsku aktivnost. Cjepivo gp100 bilo je korišteno kao aktivna kontrola za fazu III ispitivanja, koja je procjenjivala poboljšanje sveukupnog preživljenja pacijenata tretiranih s po 3 mg samo ipilimumaba ili kombinacije ipilimumaba i gp100 u usporedbi s onima koji su bili tretirani samo s cjepivom gp100. Medijan sveukupnog preživljenja pacijenata liječenih ipilimumabom bio je 10.1 mjeseci, osoba koje su liječene ipilimumabom i gp100 10 mjeseci, a sveukupno preživljenje osoba liječenih samo sa gp100 iznosilo je 6.4 mjeseci (Hodi i sur., 2010). Ovo istraživanje je dokazalo da je ipilimumab, korišten pojedinačno ili u kombinaciji sa gp100, poboljšao sveukupno preživljenje, u usporedbi s pojedinačno korištenim gp100 kod pacijenata s metastatskim melanomom koji su prethodno bili liječeni. Drugo istraživanje koje je provedeno u fazi III testiralo je ipilimumab (10 mg/kg) u kombinaciji sa dacarbazinom kod pacijenata kojima nije prethodno liječen metastatski melanom. Pacijenti su bili tretirani sa kombinacijom ipilimumaba (10 mg/kg) i dacarbazina ili su bili tretirani kombinacijom dacarbazina i placeba u tjednima 1,4,7 i 10, potom su bili tretirani samo dacarbazinom svaka 3 tjedna kroz 22 tjedna. Zatim je uslijedila terapija održavanja u kojoj su bili tretirani svakih 12 tjedana ili ipilimumabom ili placebo. Sveukupno preživljenje je bilo značajno duže u grupi koja je bila tretirana ipilimumabom i placebo (11.2 mjeseci), u odnosu na grupu koja je bila

tretirana bacarbazinom i placebom (9.1 mjeseci; Robert i sur., 2011). Ova dva istraživanja pretpostavljaju da terapija koja se temelji na imunološkom odgovoru ostvaruje kontinuirani antitumorski rezultat kod pojedinih pacijenata dugo nakon završetka primjene aktivne terapije.

Drugo antitijelo koje se koristi protiv CTLA-4 je tremelimumab. To je monoklonalno antitijelo, tj. ljudski imunoglobulin (IgG2). U fazi III ispitivanja tremelimumaba pacijenti sa neoperabilnim stadijem III i IV melanoma bili su nasumično podijeljeni na one koji su bili tretirani tremelimumabom (15 mg/kg svakih 90 dana) i na one koji su po liječnikovu odabiru bili tretirani standardnom kemoterapijom (temozolomide ili dacarbazine; Ribas i sur., 2013). Ovo ispitivanje nije uspjelo dokazati statistički značajnu prednost u preživljenju kod pacijenata sa metastatskim melanomom koji su bili tretirani tremelimumabom u odnosu na one koji su bili tretirani standardnom kemoterapijom.

5.2. PD-1

PD-1 je inhibitorni receptor koji je izražen na površini aktiviranih T-stanica. Interakcije između PD-1 i njegovih liganada PD-L1 ili PD-L2 ograničavaju funkciju T-stanica u nelimfoidnim i limfoidnim organima. PD-1 je transmembranski protein koji pripada Ig superobitelji. Proteinska struktura PD-1 sastoji se od izvanstanične N-terminalne IgV domene, transmembranske domene i citoplazmatskog repa. Za razliku od CTLA-4, citoplazmatski rep PD-1 sadrži ITIM i ITSM koji su uključeni u prenošenje inhibitornih signala (Intlekofer i Thompson, 2013). PD-1 je monomer na staničnoj površini. On ne može stvarati kovalentne veze jer mu nedostaje izvanstanični cistein, za razliku od CTLA-4 koji stvara kovalentne veze. PD-1 ima brojne varijante spojeva u aktiviranim T-stanicama, slično kao što je i slučaj sa CTLA-4. Stanice imunološkog sustava koje su u stanju mirovanja imaju minimalno izražen PD-1. Međutim, nakon aktivacije PD-1 je opsežno izražen na pobuđenim T-stanicama, B-stanicama, NK-stanicama, NKT-stanicama, DC i makrofagima. PD-1 nije izražen na mirujućim memorijskim T-stanicama koje se javljaju nakon akutnih infekcija, ali je u velikoj mjeri izražen na disfunkcionalnim T-stanicama kod kroničnih infekcija. PD-1 se veže na dva različita liganda: PD-L1 i PD-L2 koji su članovi B7 obitelji proteina. PD-L1 izražen je na površini hematopoetskih stanica uključujući DC, makrofage, B-stanice i T-stanice (Intlekofer i Thompson, 2013). PD-L1 je također izražen i na velikom broju nehematopoetskih stanica uključujući i stanice endotela te na brojnim tipovima epitelnih

stanica za razliku od B7 molekule. Upalni signali (od engl. *inflammatory signals*) rezultiraju dodatnim induciranjem PD-L1 na hematopoetskim i nehematopoetskim stanicama. Zbog široke izraženosti PD-L1, interakcija između PD-1 i PD-L1 ima veliki značaj u reguliranju odgovora djelotvornih T-stanica u perifernom tkivu, posebice na mjestima gdje se događaju upalni procesi. Brojne tumorske stanice imaju PD-L1 izražen na svojoj površini te tako inhibiraju djelotvoran antitumorski odgovor T-stanica koje imaju izražen PD-1. PD-L1, osim uloge liganda, ima sposobnost vezanja za B7-1 molekulu. Eksperimentalno je dokazano da interakcije između B7-1 i PD-L1 inhibiraju funkciju T-stanica neovisno o PD-1. Ligandi PD-L1 i PD-L2 ograničeno su izraženi APC-u, T-stanicama tumora i stanicama normalnog tkiva. Funkcije djelotvornih T-stanica su spriječene unutar limfoidnih organa zbog interakcija između PD-1 i PD-L2 (sl. 1).

PD-1 signali inhibiraju T-limfocite u potrošnji glukoze, produkciji citokina, proliferaciji i preživljavanju. CTLA-4 i PD-1 inhibiraju T-stanice u aktivaciji Akt te na taj način blokiraju unos glukoze posredovan CD28. Razlika između ova dva puta je u nivou blokade. PD-1 sprječava aktivaciju Akt regrutacijom SHP-2 koji blokiraju proksimalnu aktivaciju PI3K. Suprotno tome, vezanje CTLA-4 ne utječe na proksimalnu aktivaciju PI3K, nego blokira aktivaciju Akt preko PI3K kroz aktivnost PP2A. PD-1 posredovana inhibicija PI3K sprječava indukciju Bcl-xL, temeljem toga moguće je objasniti sposobnost vezanja PD-1 koje u nekim slučajevima dovodi do apoptoze (Intlekofer i Thompson, 2013; sl. 2).

5.2.1. BLOKIRANJE AKTIVNOSTI PD-1 U IMUNOTERAPIJI

PD-1 izražen je na limfocitima, a PD-L1 ligand može biti izražen na brojnim vrstama tumora. Iz toga možemo zaključiti da PD-1/PD-L1 signalni put ima važnu ulogu u tumorskom izbjegavanju imunološkog sustava. Širi uzorak po kojem je PD-1 izražen na normalnim stanicama je vrlo sličan uzorku na koji je PD-L1 izražen kod tumora pluća, prsa, debelog crijeva, bubrega, mjehura, jajnika i cerviksa, a također i kod ne-epitelnih tumora, uključujući melanom, glioblastom, multipli mijelom, limfom T-stanica i razne leukemije (Intlekofer i Thompson, 2013). Oslabljena antitumorska imunost je uzrokovana PD-L1 koji je izražen na mijeloidnim stanicama određenih tumora.

5.2.2. ANTI-PD-1/PD-L1 ANTITIJELA

Anti PD-1 antitijela koja su prošla klinička testiranja su nivolumab, MK3475 i pidilizumab. Prvo anti-PD-1 monoklonalno antitijelo koje je bilo klinički testirano kod

pacijenata s određenim neoplastičnim tumorima je nivolumab. Nivolumab je u potpunosti ljudsko monoklonalno imunoglobulin G4 antitijelo koje djeluje protiv PD-1. Pacijenti su primali antitijelo preko intravenozne infuzije svaka dva tjedna u tretmanskim ciklusima koji je trajao 8 tjedana. Rezultati faze Ib testiranja nivolumaba zabilježeni su kod metastatskog melanoma (sa stopom odgovora 28%), karcinoma bubrega (sa stopom odgovora 24%) i karcinoma pluća (sa stopom odgovora 18%). Medijan sveukupnog preživljenja iznosio je 9.6 mjeseci kod pacijenata koji su prethodno bili tretirani terapijom protiv karcinoma pluća (Topalian i sur., 2012). Monoterapija sa nivolumabom u dozi od 3 mg/kg trenutno se ispituje u fazi III kliničkih ispitivanja kod osoba oboljelih od metastatskog melanoma, karcinoma bubrežnih stanica i karcinoma velikih stanica pluća. Drugo anti-PD-1 antitijelo, MK-3475 testirano je u fazi I ispitivanja gdje su određene sigurne doze od 1 mg/kg, 3mg/kg i 10 mg/kg (Patanik i Tolcher, 2012). Nakon toga, ovo je antitijelo testirano kod prethodno liječenih pacijenata oboljelih od metastatskog melanoma i prethodno ne-tretiranih pacijenata u dozama od 2 mg/kg i 10 mg/kg svakih 2 ili 3 tjedna. Rezultati su dobiveni pri dozi od 10 mg/kg svaka 2 tjedna i iznosili su 56% i kod prethodno liječenih i kod prethodno ne-tretiranih pacijenata (Hamid i sur., 2013). Trenutno su u tijeku faza II (usporedba između terapije MK-3475 i kemoterapije) i faza III (u usporedbi sa ipilimumabom kod metastaziranog melanoma) ispitivanja. Treće testirano antitijelo, pidilizumab je pokazao stopu odgovora od 66%, kada je bio korišten u kombinaciji sa rituximabom kao terapija za limfom (Westin i sur., 2014). U fazi II ispitivanja uočena je stopa odgovora od 51% (Armand i sur., 2013). Trenutno je u tijeku testiranje djelotvornosti ovog antitijela kod metastatskog melanoma, karcinoma bubrega i u kombinaciji s kemoterapijom kod rektalnog karcinoma.

5.2.3. ANTI-PD-L1 ANTITIJELO

Anti-PD-L1 antitijela su BMS-936559 i MPDL3280A. Prvo klinički testirano anti-PD-L1 antitijelo je bilo BMS-936559. Ovo antitijelo je testirano u fazi I kod različitih vrsta tumora. U ovoj fazi je uočena stopa odgovora od 17% kod pacijenata s metastatskim melanomom, 12% kod pacijenata s karcinomom bubrega i 10% kod pacijenata s karcinomom pluća (Brahmer i sur., 2012). Drugo testirano monoklonalno ljudsko antitijelo usmjereno protiv PD-L1 je MPDL3280A. U fazi I ispitivanja MPDL3280A stope odgovora tretiranih pacijenata oboljelih od metastatskog melanoma, karcinoma bubrega i karcinoma pluća su bili redom: 29%, 22% i 15% (Hamid i Lawrence, 2012).

6. ZAKLJUČAK

Imunoterapija je najnovija grana moderne onkologije koja koristi imunološki sustav organizma u borbi protiv karcinoma. Imunološki sustav ima sposobnost prepoznavanja zdravih i zloćudnih stanica te aktivno sudjeluje u eliminaciji transformiranih stanica iz tijela. Cilj imunoterapije je da pomoću monoklonskih antitijela blokira aktivnost inhibitornih molekula (CTLA-4 i PD-1) koje su izražene na površini T-stanica. Različiti mehanizmi djelovanja CTLA-4 i PD-1 daju velika očekivanja za terapije u kojima se kombinira blokiranje oba inhibitorna receptora kako bi se dobio snažan antitumorski imunološki odgovor. Primarna uloga CTLA-4 je u sprječavanju aktivnosti T-stanica i klonalnom umnožavanju tih stanica, dok je primarna uloga PD-1 je ograničavanje aktivacije efektorskih T-stanica u perifernim tkivima. Pretklinička istraživanja monoklonskih antitijela koja blokiraju inhibitornu funkciju CTLA-4, PD-1 i PD-L1 pokazala su djelotvornost. Modulacija kontrolnih točaka pokazala se učinkovitom u terapiji određenih vrsta tumora (metastatski melanom, karcinom bubrega i karcinom pluća). Dugoročno praćenje rezultata istraživanja potvrdilo je velika očekivanja od lijekova koji blokiraju inhibitore imunološkog sustava. Istodobno liječenje ipilimumabom (inhibitor CTLA-4) i nivolumabom (inhibitor PD-L1) ima značajan medijan u preživljenju pacijenata koji boluju od uznapredovalog melanoma. Smatra se da će najefikasniji način liječenja solidnih tumora biti kombinirana primjena imunoterapije i kemoterapije.

7. LITERATURA

Guyton A.C., 1995. Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti. 5.izd. Preveli sa engleskog jezika Ana Andreis, Igor Andreis, Jagoda Roša i Marija Soljačić, Medinciska naklada, Zagreb pp. 253.

Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, ... , Ribas A, 2013. Safety and tumor responses with lamrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl J. Med*, **369**, 134-144.

Hentges D.J., 1995. Microbiology & Immunology. 2nd ed., Little Brown and company, Boston, Massachusetts, pp. 24.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, ... , Urban WJ, 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl J. Med* **363**, 711-723.

Igney FH, Krammer PH, 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*, **71**, 907-20.

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ, 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* **27**, 16–25.

Patnaik AKS, Tolcher AW, 2012. Phase I study of MK-3475 (anti-Pd-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **30**, 2512.

Ribas A, Hanson DC, Noe DA, Millham R, Guyot DJ, Bernstein SH, ... , Gomez-Navarro J, 2007. Tremelimumab (CP-675, 206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. *Oncologist* **12**, 873-883.

Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Conto C, Wolchok J, 2013. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N. Engl J. Med* **368**, 1365-1366.

Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Grabe C, Lebbe C, ... , Wolchok JD, 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl J. Med*, **364**, 2517-2526.

Swann JB, Smyth M, 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* **117**, 1137–1146.

Tchekmedyian SGJ, Korman A, Keler T, Deo Y, Davis TA, 2002. MDX-010 (human anti-CTLA-4): a phase I trial in malignant melanoma. *The American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*. The American Society of Clinical Oncology : Virginia USA.

Thompson CB, Intlekofer AM, 2013. At the Bench: Preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* **94**, 25–39.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, ... , Sznol M, 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl J. Med*, **366**, 2443-2454.

Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, ... , Neelapu SS, 2014. Safety and activity of PD-1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase II trial. *Lancet Oncol* **15**, 69-77.

8. SAŽETAK

Stanice imunološkog sustava koje imaju esencijalnu ulogu u obrani od tumora su T-stanice. Tumorske stanice koriste različite mehanizme kako bi spriječili aktivaciju T-stanica, a samim time i djelotvoran imunološki odgovor organizma. Tumori mogu stimulirati signalizacijske putove inhibitorskih molekula (CTLA-4 i PD-1) koje su izražene na površini T-stanica. CTLA-4 i PD-1 imaju različite mehanizme djelovanja; CTLA-4 sprječava klonalno umnožavanje T-stanica, a PD-1 ograničava funkcije efektorskih T-stanica. Blokiranjem inhibitorskih receptora možemo dobiti djelotvoran antitumorski odgovor koji se može koristiti u imunoterapiji. Novi lijekovi su zapravo monoklonska antitijela koja su usmjerena na razoružavanje obrane tumora u odnosu na naš imunološki sustav. Istraživanja su pokazala dobre rezultate u liječenju uznapredovalog melanoma, karcinoma bubrega i karcinoma pluća. Klinički testirani lijekovi koji najviše obećavaju su ipilimumab (blokator CTLA-4) i nivolumab (inhibitor PD-1).

9. SUMMARY

Immune system cells, which play an essential role in the defense against tumors are T-cells. Tumor cells use different mechanisms to prevent activation of T-cells, and thus an effective immune response of the body. Tumors may stimulate inhibitory signaling pathway molecules (CTLA-4 and PD-1) which are expressed on the surface of T-cells. CTLA-4 and PD-1 have different mechanisms of action; CTLA-4 prevents clonal multiplication of T cells and PD-1 limits the function of effector T-cells. By blocking the inhibitory receptor we can get effective antitumor response which can be used in immunotherapy. New drugs are actually monoclonal antibodies directed to tumor disarming defense in relation to our immune system. Studies have shown good results in the treatment of advanced melanoma, renal cancer and lung cancer. The most promising clinically evaluated drugs are ipilimumab (blockers of CTLA-4) and nivolumab (inhibitor of PD-1).